



CONFÉDÉRATION SUISSE
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑪ CH 660 633 A5

⑤① Int. Cl. 4: G 01 N 21/64
G 01 N 33/543

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

⑫ FASCICULE DU BREVET A5

⑲ Numéro de la demande: 5306/84

⑳ Date de dépôt: 06.11.1984

㉔ Brevet délivré le: 15.05.1987

④⑤ Fascicule du brevet
publié le: 15.05.1987

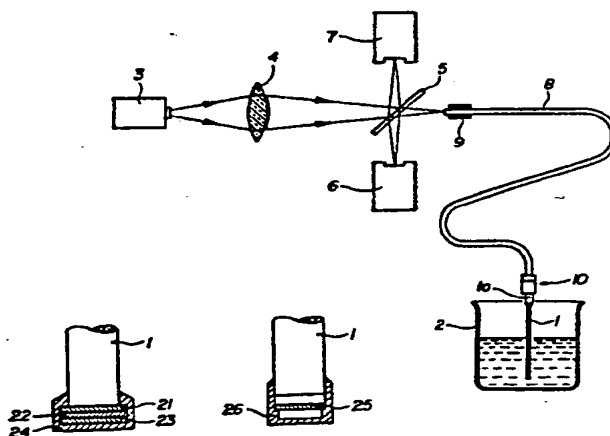
⑦③ Titulaire(s):
Battelle Memorial Institute, Carouge GE

⑦② Inventeur(s):
Ringrose, Anthony, Chêne-Bougeries
Sutherland, Ranauld Macdonald, Carouge GE
Dähne, Claus, Onex
Place, John Francis, Genève

⑦④ Mandataire:
Blasco Dousse, Carouge GE

⑤④ Appareil d'analyse pour la détermination optique de substances en solution.

⑤⑦ Cet appareil comprend, en tant que ses éléments optiques principaux, un guide d'onde (1) porteur d'un réactif spécifique d'une substance analytique à déterminer. On injecte de la lumière à l'une des extrémités du guide d'onde (extrémité proximale) et cette lumière est réfléchiée par l'autre extrémité (24), (extrémité distale) de manière qu'elle parcoure le guide dans un sens et dans l'autre avant d'être recueillie. Au cours de son trajet, elle interagit avec un complexe qui se forme à la surface du guide à la suite de la réaction dudit réactif avec la substance analytique, cette réaction engendrant la formation d'un signal optique analytique de longueur d'onde différente de celle du signal d'excitation. L'extrémité distale du guide d'onde est munie de moyens de filtrage (21, 22, 23, 24, 25) arrêtant la fraction résiduelle du signal d'excitation et réfléchissant le signal analytique, ceci afin de réduire le bruit de fond.



REVENDECATIONS

1. Appareil pour analyse immunologique comprenant une sonde (1) à fibre optique reliée par un élément de couplage (10) à un système optique comportant principalement une source (3) fournissant un signal d'excitation λ_1 , un détecteur (6) de signal d'analyse λ_2 et des moyens (5) de séparation d'ondes pour séparer ledit signal analytique de longueur d'onde λ_2 dudit signal d'excitation de longueur d'onde λ_1 , ladite fibre étant revêtue d'une substance bioréactive capable de se lier spécifiquement avec une substance à analyser dissoute dans un échantillon de solution à analyser et de fournir ainsi un complexe de type immunologique, ce qui engendre un signal analytique fluorescent λ_2 lors de l'interaction dudit signal d'excitation λ_1 injecté dans ladite sonde et ledit complexe, ledit signal analytique étant renvoyé par réflexion, grâce à l'extrémité (24) de la sonde agissant comme miroir, l'élément de couplage (10) et les moyens de séparation d'ondes (5), au détecteur (6) de façon que celui-ci le recueille et par cela fournisse l'information analytique recherchée, caractérisé en ce que l'extrémité de la fibre de la sonde est munie de moyens (21, 22, 23, 24, 25) permettant de bloquer le signal incident λ_1 , et de renvoyer le signal λ_2 au détecteur.

2. Appareil suivant la revendication 1, caractérisé en ce que les moyens pour renvoyer le signal analytique, pour arrêter λ_1 et réfléchir λ_2 , consistent en un miroir filtrant dichroïque (21, 22, 23) placé à l'extrémité de la sonde.

3. Appareil suivant la revendication 1, caractérisé en ce que les moyens pour arrêter λ_1 consistent en un filtre (25) d'absorption interposé entre l'extrémité de la fibre et l'extrémité terminale réfléchissante de la sonde.

4. Appareil suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend, de plus, intercalée entre la sonde et ledit système optique, une portion (8) de fibre optique flexible, la sonde étant reliée à celle-ci de manière amovible grâce à un élément de couplage (10) et de retenue à pression.

5. Appareil suivant la revendication 4, caractérisé en ce que l'élément de couplage à pression consiste en une douille creuse (13) fixée de manière permanente à l'une des extrémités (8) de ladite portion flexible de fibre optique, ladite douille ayant une ouverture distale destinée à recevoir l'extrémité libre de la sonde et, maintenu dans un logement (12) de ladite douille en communication avec ladite ouverture, un organe de serrage à bille (11) et à ressort (15) agissant sur l'extrémité proximale nue de la sonde (1) de manière que celle-ci, après qu'elle a été introduite dans ladite ouverture, soit retenue par pincement en position de couplage optique avec ladite portion flexible de fibre.

6. Utilisation de l'appareil suivant la revendication 1 pour l'analyse de liquides biologiques.

La présente invention concerne un appareil d'analyse pour la détermination optique de substances en solution, plus particulièrement pour la détermination de substances bioactives par des réactions de type immunologique.

On connaît déjà des appareils d'analyse comprenant des sondes en fibre optique qui peuvent traduire optiquement l'absorption d'espèces chimiques à la surface du cœur de la fibre. Cette technique est basée sur la séquence opérationnelle suivante: on immerge dans la solution à analyser un guide d'onde optique illuminé, par exemple une fibre optique privée de son revêtement, dont l'indice de réfraction est supérieur à celui de la solution à analyser; il se produit alors entre le composant d'onde évanescente du rayon parcourant le guide d'onde et certaines substances en solution une interaction que l'on peut mesurer. Cette technique présente un intérêt particulier pour déterminer l'existence de certains événements se déroulant dans une zone réactionnelle à proximité immédiate de la fibre, c'est-à-dire

dans la zone du composant d'onde évanescente (quelques centièmes à quelques dizaines de μm), ce phénomène se produisant dans le cas des analyses basées sur la réaction d'un premier partenaire d'une réaction de complexation, ce partenaire étant absorbé ou déposé sous forme de revêtement à la surface de la sonde, avec un second partenaire dissous dans la solution de l'échantillon.

Des appareils convenant à ce type de mesure ont été divulgués récemment dans les références suivantes: WO84/00817; USP 4,447,546 (HIRSCHFELD et al.); GB 2,103,786 (ICI); J.D. ANDRADE et al., Applied Optics 23 (11) 1984, 1812-1815; WO-A-84/817; EP-A-54292 et US-A-3947088.

Dans les appareils de l'art antérieur, la sonde optique (c'est-à-dire la fibre optique dont le revêtement a été partiellement éliminé) est reliée (couplée) au niveau de son extrémité proximale à un système optique comprenant un dispositif d'excitation et de détection et comportant généralement une source de lumière fournissant un signal d'excitation à la longueur d'onde λ_1 , un miroir diviseur d'ondes pour séparer le signal et le diriger, d'une part, vers l'extrémité proximale de la fibre et, d'autre part, en direction d'un photodétecteur orienté à un certain angle par rapport à la source et agencé de manière à détecter le signal analytique en provenance de la fibre, ce miroir séparateur d'ondes effectuant la séparation entre les signaux lumineux incidents et émergents.

Suivant certaines formes préférentielles d'exécution de la technique antérieure, le signal analytique est un signal fluorescent engendré par un composant de la substance en réaction dont la longueur d'onde λ_2 est supérieure à λ_1 . En conséquence, le miroir diviseur d'ondes est de préférence un miroir dichroïque, c'est-à-dire un filtre d'interférence passe-bas dont la fréquence d'atténuation est comprise entre le maximum d'absorption et le maximum de fluorescence du signal engendré par le fluorophore en question. Cet arrangement permet une séparation efficace entre les deux signaux.

En ce qui concerne maintenant la sonde elle-même, celle-ci est généralement constituée par une portion de fibre optique privée de son revêtement normal à indice de réfraction peu élevé. Cette sonde est généralement revêtue d'un film de l'un des produits réactifs impliqués dans une réaction immunologique, c'est-à-dire un anticorps spécifique d'un antigène à analyser. Lorsque la sonde illuminée est immergée dans la solution à analyser, l'antigène réagit à la surface de la fibre en produisant un complexe immunologique capable d'engendrer un signal de fluorescence lorsqu'il est excité par le composant d'onde évanescente, ce signal étant renvoyé au détecteur par l'intermédiaire de la fibre et du système de couplage optique. Il se peut cependant qu'un signal perturbateur (bruit de fond) soit produit lors de l'interaction du signal d'excitation issu de la fibre à son extrémité terminale et le corps de l'analyse et, pour éviter ce désavantage, l'extrémité de la fibre a été soit noircie, soit rendue entièrement réfléchissante. Dans le premier cas, aussi bien le signal incident que le signal envoyé en retour sont absorbés, ce qui entraîne une diminution correspondante du signal de réponse et, dans le second cas, aussi bien le signal incident que le signal de fluorescence sont envoyés en retour au séparateur avec pour conséquence un rapport relativement élevé du bruit de fond au signal.

La présente invention, telle que définie à la revendication 1, remédie à cette situation. De manière à la décrire avec plus de détails, on se référera au dessin en annexe.

La fig. 1 est une représentation diagrammatique d'un instrument d'analyse suivant l'invention.

La fig. 2 est une vue en coupe à l'échelle agrandie d'un détail, c'est-à-dire des moyens de couplage entre la sonde et le reste de la fibre optique.

La fig. 3 est une vue en coupe de l'extrémité de la sonde avec une forme d'exécution de moyens pour bloquer par filtrage le signal incident et pour réfléchir le signal analytique.

La fig. 4 est une vue en coupe d'une autre modification de tels moyens.

L'appareil représenté à la fig. 1 comprend essentiellement une sonde 1 immergée dans un récipient 2 contenant une solution à ana-

lyser. La sonde 1 est une section de fibre optique dont le revêtement a été enlevé sur la presque totalité de sa longueur; il en reste cependant une petite portion désignée par 1a dont le revêtement n'a pas été éliminé dans le but d'assurer un couplage mécanique convenable avec le reste de l'appareil comme on le verra ultérieurement.

La portion nue inférieure de la fibre devant être trempée dans le liquide de l'échantillon est revêtue d'une couche d'un matériau réactif susceptible de se lier avec l'analyte dissous dans l'échantillon à analyser et contenu dans le récipient 2, de manière que se forme à la surface du guide un complexe qui émet une lumière de fluorescence de longueur d'onde λ_2 (signal analytique).

Le présent appareil comprend encore des éléments optiques comprenant une source de lumière 3, des moyens de focalisation 4, des moyens de division d'onde 5, un détecteur du signal analytique 6, un détecteur du signal de référence 7 et une longueur de fibre optique flexible 8 maintenue par des moyens de positionnement 9 dans une position optique convenable relative aux moyens de focalisation, de manière à pouvoir recevoir le signal d'excitation à la longueur d'onde λ_1 provenant de la source 3 suivant un angle correct permettant sa propagation par réflexions multiples le long de la fibre 8. Les éléments 3 à 8 sont bien connus de l'état de la technique (voir les références susmentionnées) et il n'est pas nécessaire de les détailler plus avant ici; il suffit de mentionner que les détecteurs 6 et 7 sont normalement reliés de manière appropriée à des circuits destinés à traiter les signaux détectés, à les amplifier, à faire la discrimination et le calcul des résultats sous forme de signaux électriques et à les afficher sous forme de signes lisibles sur des appareils d'affichage convenables, une telle technologie étant en soi parfaitement connue des spécialistes de ce genre de technique.

Le segment de fibre optique flexible 8 est couplé à la sonde par des moyens de couplage 10 représentés plus en détail à la fig. 2. De tels moyens comprennent essentiellement 3 billes 11 (seules deux d'entre elles sont représentées au dessin) logées dans un logement de forme tronconique 12 d'un organe de couplage 13 et qui exercent une action de serrage sur l'extrémité proximale de la sonde 14 en raison de l'action d'un ressort de compression 15 reposant, d'une part, contre la paroi antérieure 16 du logement 12 et, d'autre part, sur les billes 11 par l'intermédiaire d'un anneau de plastique 17. On peut donc facilement, par une traction, détacher la sonde 1 du dispositif de couplage et la remplacer de manière interchangeable par une nouvelle sonde lorsque la première a été utilisée dans une opération d'analyse.

Pour renvoyer le signal de longueur d'onde λ_2 dirigé vers l'extrémité de la sonde, ce signal étant engendré par la réaction de fluorescence des réactifs à la surface de la sonde, on a placé un miroir dichroïque à l'extrémité distale de la fibre 1, comme représenté à la fig. 3. Ce miroir dichroïque comprend trois couches de matériau transparent 21, 22, 23 dont les indices de réfraction sont choisis de manière que la longueur d'onde λ_1 du signal incident soit filtrée et arrêtée tandis que le signal de longueur d'onde λ_2 est réfléchi librement. Pour sélectionner les matériaux filtrants possédant les indices de réfraction convenables, on peut utiliser les techniques connues (voir par exemple *Applied Optics and Optical Engineering*, éditeur R. KINGSLAKE, Vol. 1, pages 316-322, Academic Press, New York). Le miroir comprend encore une couche terminale 24 entièrement réfléchissante (par exemple de l'aluminium poli) qui réfléchit le signal λ_2 , le retourne dans la sonde et de là au détecteur 6.

Dans une autre forme d'exécution (fig. 4), l'extrémité distale de la sonde comporte un filtre optique fait d'une substance capable

d'absorber sélectivement le signal de longueur d'onde λ_1 et de donner libre passage au signal analytique de longueur d'onde λ_2 . Cette disposition comporte, comme dans la forme d'exécution précédente, un miroir métallique 26 constitué par une couche polie entièrement réfléchissante. De tels filtres à bandes étroites du type utilisés dans cette forme d'exécution sont bien connus et disponibles commercialement chez les fabricants de composants optiques.

On peut brièvement décrire le fonctionnement du présent appareil comme suit:

On commence par revêtir la partie nue de la sonde 1 par un composant réactif susceptible de fixer sélectivement une substance particulière contenue dans l'analyte à analyser. De plus, lorsque le complexe ainsi obtenu n'émet pas de fluorescence par lui-même, on procède à un marquage par une substance fluorescente, celle-ci étant liée soit à l'un soit à l'autre des réactifs, étant entendu cependant que, en l'absence du produit désiré résultant de la réaction immuno-logique, il ne se produit pas de fluorescence (ou seulement une fluorescence minimale).

On relie ensuite la sonde, après l'avoir convenablement rincée et séchée, à la portion flexible 8 au moyen du coupleur 10. On enclenche les composants optiques 3 à 7 ainsi que les organes électroniques et on immerge la sonde illuminée dans le récipient 2 qui contient l'analyte à analyser grâce à la réaction spécifique susmentionnée se déroulant à la surface de la sonde.

Lorsque la réaction se déroule, il se produit, par fluorescence, à la surface de la sonde un signal analytique de longueur d'onde λ_2 , ce signal de fluorescence étant produit par l'interaction du composant d'onde évanescente du signal d'excitation de longueur d'onde λ_1 et la couche de complexe entre l'analyte et le réactif. Le signal analytique dirigé vers l'arrière s'en retourne directement le long de la fibre en direction du détecteur 6 par l'intermédiaire de la portion de fibre 8, et le diviseur d'onde 5 alors que le composant du signal analytique dirigé vers l'avant parvient tout d'abord à l'extrémité distale de la sonde d'où il est réfléchi vers l'arrière par le miroir 24, 26, après qu'il a traversé la portion de filtre (voir les fig. 3 et 4) interposée entre l'extrémité de la fibre et le miroir. Simultanément, le composant d'onde d'excitation se dirigeant vers l'avant est éliminé par absorption. Cette technique permet d'améliorer le rapport signal/bruit lors du captage de celui-ci par le détecteur 6 et permet d'améliorer la sensibilité du signal pour une intensité d'entrée donnée ou de diminuer l'énergie d'entrée nécessaire sans devoir sacrifier la sensibilité.

Le fonctionnement des circuits de calculs et d'affichage est identique à ce qui est connu des techniques antérieures et il n'est pas nécessaire de le développer plus avant ici.

On remarquera que, lors de l'utilisation du présent appareil dans le domaine des analyses immunologiques, il n'est nullement indispensable que le liquide dans lequel on immerge la sonde pour en déterminer certains composants soit transféré, avant analyse, dans un récipient de laboratoire, par exemple par prélèvement chez un patient, notamment dans le cas des analyses de sang. Ainsi, la sonde du présent appareil peut-elle être directement introduite, *in situ*, dans le système circulatoire d'un patient ou, à défaut, être placée dans une branche de dérivation artificielle temporaire de ce système, par exemple lors d'une intervention. De manière générale, la sonde de l'appareil de l'invention est constituée d'éléments optiques et mécaniques suffisamment fins pour que son utilisation dans de tels tests directs ne présente qu'un minimum d'inconvénients pour le malade.

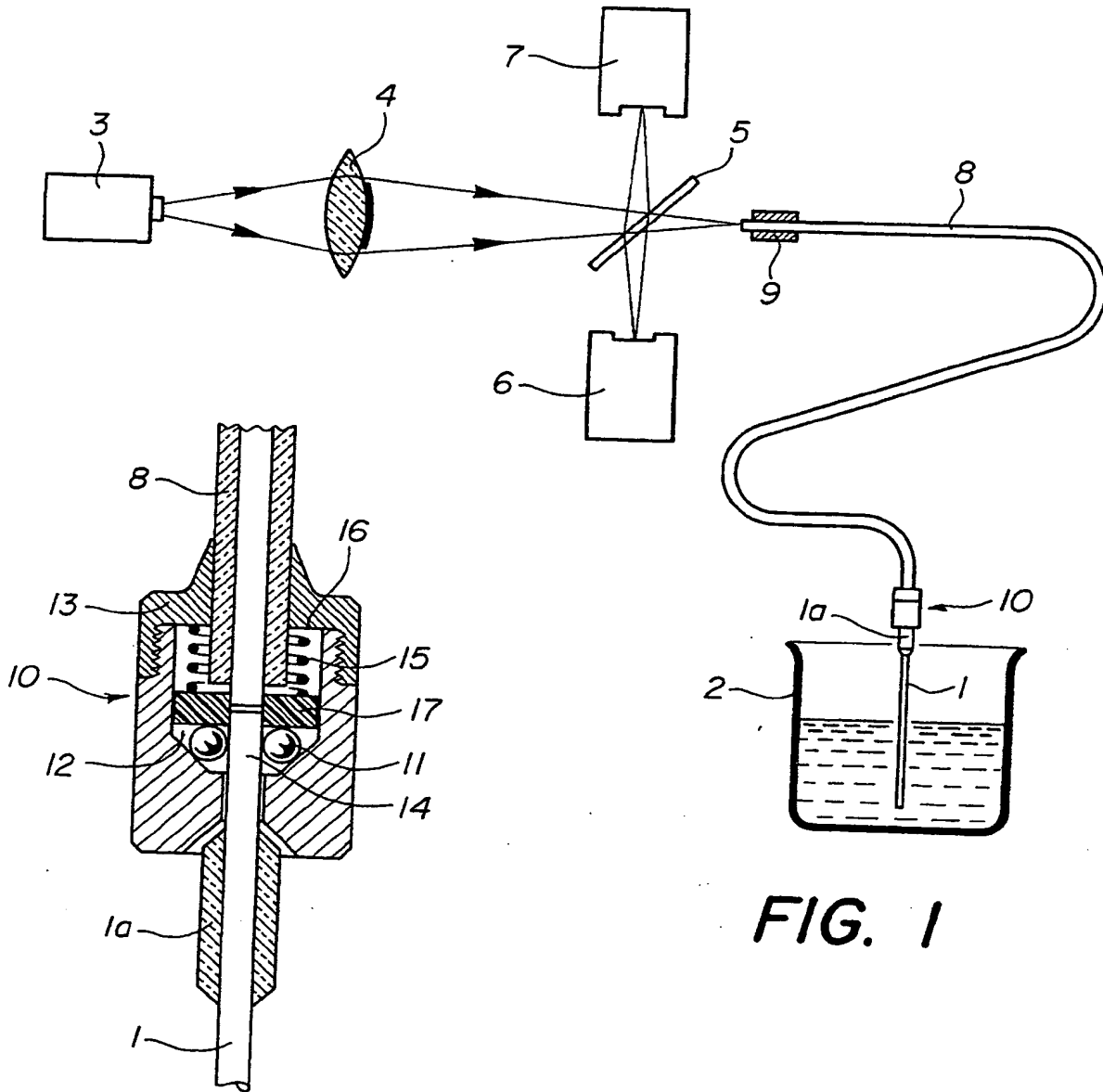


FIG. 2

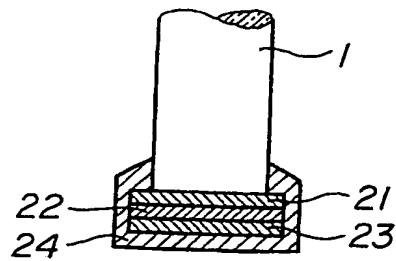


FIG. 3

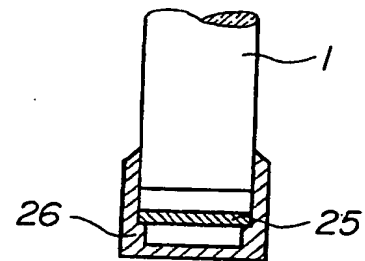


FIG. 4